



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>4</sup> :  C07K 13/00, 7/06, 7/08 C12P 21/02, A61K 37/02		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 89/04837  (43) Date de publication internationale: 1er juin 1989 (01.06.89)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00566</p> <p>(22) Date de dépôt international: 18 novembre 1988 (18.11.88)</p> <p>(31) Numéro de la demande prioritaire: 87/15984</p> <p>(32) Date de priorité: 19 novembre 1987 (19.11.87)</p> <p>(33) Pays de priorité: FR</p> <p>(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur-Calmette, B.P. 245, F-59019 Lille (FR). INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).</p>		<p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SPIK, Geneviève [FR/FR]; 39, résidence du Moulin, Rue de la Pilaterie, F-59700 Marcq-en-Baroeul (FR). TARTAR, André [FR/FR]; Rue du Moulin, F-62490 Vitry-en-Artois (FR). MONTREUIL, Jean [FR/FR]; 145, rue Jules-Bouclier, F-59650 Villeneuve-d'Ascq (FR).</p> <p>(74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p>	

## Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.  
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

(54) Title: PROTEIN HOMOLOGUE OF HUMAN ANGIOGENINE

(54) Titre: PROTEINE HOMOLOGUE DE L'ANGIOGENINE HUMAINE

## (57) Abstract

The invention concerns a new protein of approximately 17 KD, with angiogenic activity, a process for isolating it from mammalian milk, therapeutic compositions containing it, a process for detecting and/or determining the content of mammalian angiogenines, their homologues and their fragments. Said protein, of bovine origin, has a sequence of 125 aminoacids, 81 of which are common to human angiogenine, and a molecular weight of approximately 17 KD, and is extracted from mammalian milk. Application to the detection of mammalian angiogenine.

## (57) Abrégé

La présente invention est relative à une nouvelle protéine d'environ 17 KD, à action angiogénique, à son procédé d'isolement à partir de lait de mammifères, à des compositions thérapeutiques la contenant, à un procédé de détection et/ou de dosage des angiogénines de mammifères, de leurs homologues et de leurs fragments. Ladite protéine, d'origine bovine présentant une séquence de 125 amino-acides, dont 81 sont communs avec l'angiogénine humaine et ayant un poids moléculaire d'environ 17 KD, est extraite de lait de mammifère. Application à la détection des angiogénines de mammifères.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

## PROTEINE HOMOLOGUE DE L'ANGIOGENINE HUMAINE

5

La présente invention est relative à une nouvelle protéine d'environ 17 KD, à action angiogénique, à son procédé d'isolement à partir de lait de mammifères, à des compositions thérapeutiques la contenant, à un procédé de détection et/ou de dosage, ainsi qu'à des réactifs immunologiques de détection et/ou de dosage des angiogénines de mammifères, de leurs homologues et de leurs fragments.

A la suite du travail de pionnier de J. FOLKMAN (cf. J. Exp. Med., 133, 275 (1971)), qui a démontré que la croissance d'une tumeur requiert une alimentation sanguine importante, celle-ci étant réalisée par la croissance continue de nouveaux vaisseaux sanguins ; il a suggéré que cette croissance résulte de la présence d'une substance diffusible qu'il a dénommée "Tumor angiogenesis factor" (TAF), plusieurs protéines qui stimulent l'angiogénèse ont été isolées (FOLKMAN et al., Science, (1987), 235, 442). Parmi ces substances, l'angiogénine, protéine d'origine humaine, a été purifiée par l'Equipe de VALLEE, de même que le clonage de son

- 2 -

gène. En 1985, FETT J.W. et al., (Biochem, (1985), 24, 5480-5486) ont isolé l'angiogénine humaine à partir de cellules intestinales humaines cancéreuses en culture. Les cellules intestinales HT 29 sécrètent l'angiogénine humaine 5 dans le milieu de culture. A partir de ces milieux de culture ne renfermant pas de sérum, 0,5 µg/litre d'angiogénine humaine a été isolée. L'équipe de VALLEE a déterminé la concentration en angiogénine tout d'abord par la méthode de Bradford (Anal. Biochem., 1975, 72, 248-254 méthode par 10 fixation de colorant, en utilisant la SAB comme standard), puis par la méthode décrite dans Biochem, 1986, 25, 3527, 3732, par SHAPIRO et Al.. La séquence en amino-acides a été également précisée par STRYDOM et Al. (BIOCHEMISTRY (1985), 24, p. 5486-5494).

15 L'angiogénine humaine est une protéine dont la masse moléculaire est de 14 400 D.

L'angiogénine isolée de cellules tumorales humaines comprend une seule chaîne protéinique comprenant 123 amino-acides et dont la séquence est la suivante :

20

Gln-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-Phe-Leu-Thr-Gln-His-Thr-Asp<sup>15</sup>-Ala-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-Cys-Glu-Ser-Ile-Met<sup>30</sup>-Arg-Arg-Arg-Gly-Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Arg-Ile-Asn-Thr-Phe<sup>45</sup>-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-Lys<sup>60</sup>-Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Ile-Ser-Lys Ser-Ser<sup>75</sup>-Phe-Gln-Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly-Gly-Ser-Pro-Trp-Pro<sup>90</sup>-Pro-Cys-Gln-Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-Asn-Val-Val-Val<sup>105</sup>-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly-Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Gln-Ser-Ile-Phe<sup>120</sup>-Arg-Arg-Pro<sup>123</sup>-OH

30 L'amino-acide C-terminal est la proline ; trois ponts disulfure lient les cystéines 26-81, 39-92 et 57-107.

35 La séquence de l'angiogénine humaine est homologue à 35% de celle de la ribonucléase humaine pancréatique, en

- 3 -

particulier en ce qui concerne les amino-acides essentiels à l'activité ribonucléolytique (cf. BIOCHEMISTRY, (1985), 24, 5494-5499. KURACHI et Al.). L'activité de l'angiogénine humaine est importante, puisque 50 ng, soit 3,5 picomoles, 5 sont capables d'entraîner une vascularisation de la cornée de lapin et 35 fentomoles sont capables d'induire la vascularisation de l'embryon de poulet.

Il est connu de préparer l'angiogénine humaine par clonage. Le clonage du gène codant pour l'angiogénine humaine permet de préparer des quantités satisfaisantes par l'intermédiaire de systèmes d'expression adéquats. Néanmoins, de telles méthodes sont coûteuses.

Il s'est avéré nécessaire de rechercher un composé qui présenterait des propriétés similaires à celles de l'angiogénine humaine et dont le procédé d'obtention serait plus simple et moins coûteux.

La présente invention s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à une nouvelle protéine présentant des propriétés similaires à celles de l'angiogénine humaine, obtenue par des moyens peu coûteux et faciles à mettre en œuvre, permettant des rendements quantitatifs élevés.

C'est aussi un but de l'invention de pourvoir à un nouveau procédé d'obtention de ladite protéine, ne présentant pas les inconvénients des procédés de l'Art antérieur ; en effet, ce nouveau procédé permet d'obtenir d'importantes quantités de la protéine en question à un coût très bas, ce qui, dans le cadre de la fabrication industrielle de compositions pharmaceutiques contenant cette protéine, présente des avantages importants.

30 C'est encore un but de l'invention de pourvoir à des compositions pharmaceutiques contenant ladite protéine.

C'est également un but de l'invention de pourvoir à un agent de détection et de dosage des angiogénines de mammifères, de leurs homologues, de leurs fragments, dans des 35 fluides biologiques.

- 4 -

C'est en outre un but de l'invention de pourvoir à un kit de détection et de dosage des protéines susdites dans lesdits fluides.

La présente invention a pour objet une protéine, 5 caractérisée en ce qu'elle présente une séquence qui comporte 125 amino-acides, et répond à la formule I ci-après :

(I) Ala<sup>1</sup>-Gln-Asp-Asp-Tyr<sup>5</sup>-Arg-Tyr-Ile-His-Phe<sup>10</sup>-  
Leu-Thr-Gln-His-Tyr<sup>15</sup>-Asp-Ala-Lys-Pro-Lys<sup>20</sup>-  
Gly-Arg-Asn-Asp-Glu<sup>25</sup>-Tyr-Cys-Phe-Asn-Met<sup>30</sup>-  
10 Met-Lys-Asn-Arg-Arg<sup>35</sup>-Leu-Thr-Arg-Pro-Cys<sup>40</sup>-  
Lys-Arg-Arg-Asn-Thr<sup>45</sup>-Phe-Ile-His-Gly-Asn<sup>50</sup>-  
Lys-Asn-Arg-Ile-Lys<sup>55</sup>-Ala-Ile-Cys-Glu-Asp<sup>60</sup>-  
Arg-Asn-Gly-Gln-Pro<sup>65</sup>-Tyr-Arg-Gly-Asp-Leu<sup>70</sup>-  
Arg-Ile-Ser-Lys-Ser<sup>75</sup>-Glu-Phe-Gln-Ile-Thr<sup>80</sup>-  
15 Ile-Cys-Lys-His-Lys<sup>85</sup>-Gly-Gly-Ser-Ser-Arg<sup>90</sup>-  
Pro-Pro-Cys-Arg-Tyr<sup>95</sup>-Gly-Ala-Thr-Glu-Asp<sup>100</sup>-  
Ser-Arg-Val-Ile-Val<sup>105</sup>-val-Gly-Cys-Glu-Asn<sup>110</sup>-  
Gly-Leu-Pro--Val-His<sup>115</sup>-Phe-Asp-Glu-Ser-Phe<sup>120</sup>-  
Ile-Thr-Pro-Arg-His<sup>125</sup>-OH,

20

en ce que 81 amino-acides de sa séquence sont communs avec l'angiogénine humaine, et en ce que son poids moléculaire est d'environ 17 KD.

La masse moléculaire a été évaluée en comparant la 25 vitesse de migration électrophorétique de ladite protéine bovine à celle des témoins suivants : la myoglobine (P.M. : 17 200), la myoglobine 1 + 2 (P.M. : 14 600), la myoglobine A (P.M. : 8 240), la myoglobine 2 (P.M. : 6 380), la myoglobine 3 (P.M. : 2 560) (Pharmacia).

30

Dans la composition de ladite protéine 17 KD, déterminée après hydrolyse acide totale, les amino-acides suivants sont présents dans les proportions ci-après :

Phé : 6, Leu : 4, Ile : 9, Met : 2, Val : 4, Pro : 7, 35 Ser : 6, Thr : 6, Ala : 4, Tyr : 6, His : 6, Glu(Gln) : 10, Asp(Asn) : 16, Lys : 9, Arg : 15, Gly : 9, Cys : 6.

- 5 -

Conformément à l'invention, ladite protéine est obtenue par extraction de lait de mammifères, notamment de vache ou par clonage ou par voie de synthèse.

La présente invention a également pour objet des 5 peptides qui constituent des fragments de la protéine 17KD conforme à l'invention, elle couvre en particulier :

- un peptide qui présente la séquence suivante en amino-acides :

10 Glu-Asp<sup>60</sup>-Arg-Asn-Gly-Gln-Pro<sup>65</sup>-Tyr-Arg-Gly-Asp-  
Leu<sup>70</sup>-Arg-Ile-Ser

dont 9 restes sur 15 s'alignent sur la séquence 58-72 de l'angiogénine humaine.

- un peptide qui présente la séquence suivante en amino-acides :

15 Phe-Asp-Glu-Ser-Phe<sup>120</sup>-Ile-Thr-Pro-Arg-His<sup>125</sup>

et qui correspond au fragment C terminal de la protéine 17 KD

- un peptide présentant la séquence suivante en amino-acides :

Glu-Asn<sup>110</sup>-Gly-Leu-Pro-Val-His<sup>115</sup>-Phe

20 qui s'aligne sur la séquence 108-115 de l'angiogénine humaine, dans laquelle séquence 7 restes sur 8 sont identiques ;

- un peptide présentant la séquence en amino-acides suivante :

25 Ile-Val<sup>105</sup>-Val-Gly-Cys-Glu.

dont 4 restes sur 6 s'alignent sur la séquence 103-108 de l'angiogénine humaine ;

- un peptide présentant la séquence suivante en amino-acides :

30 Arg-Tyr-Ile-His-Phe<sup>10</sup>-Leu-Thr-Gln-His-Tyr<sup>15</sup>-Asp-Ala-Lys

dont 11 restes sur 13 s'alignent sur la séquence 5-17 de l'angiogénine humaine ;

- un peptide présentant la séquence suivante en amino-acides :

35 Asn-Thr<sup>45</sup>-Phe-Ile-His-Gly-Asn<sup>50</sup>-Lys,

- 6 -

qui se distingue par une homologie totale avec la séquence 43-50 de l'angiogénine humaine.

- un peptide qui présente la séquence en amino-acides suivante :

5 Ile-Lys<sup>55</sup>-Ala-Ile-Cys-Glu,

qui se distingue également par une homologie totale avec la séquence 53-58 de l'angiogénine humaine.

- un peptide qui présente la séquence suivante en amino-acides :

10 Leu<sup>70</sup>-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser<sup>75</sup>-Glu-Phe-Gln

dont 8 restes sur 10 s'alignent sur la séquence 69-77 de l'angiogénine humaine.

- un peptide qui présente la séquence suivante en amino-acides :

15 Arg<sup>67</sup>-Gly-Asp,

ledit peptide étant reconnu par un récepteur des cellules endothéliales.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de ladite protéine conforme à 20 l'invention, caractérisé en ce que ladite protéine est extraite de lait de mammifère, notamment de vache.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à l'invention, l'extraction de ladite protéine est réalisée par chromatographie par échange de 25 cations, suivie d'une élution par un éluant approprié.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, l'éluant est un sel alcalin d'un acide organique faible, notamment de l'acétate de sodium.

Selon une autre disposition avantageuse, la fraction éluée est soumise à une deuxième chromatographie par échange de cations.

La protéine ainsi isolée est purifiée par chromatographie sur une colonne de gel-filtration.

La protéine ainsi purifiée est obtenue avec un rendement de l'ordre de 0,5 mg/litre de lait.

- 7 -

En variante à ce mode de mise en oeuvre, préalablement à l'extraction, le lait d'origine bovine est soumis à une délipidation.

5 Selon une disposition avantageuse, la délipidation est réalisée par centrifugation.

Selon une modalité avantageuse de cette disposition, la centrifugation est réalisée à 4000 g pendant 30 mn et à une température de 4°C.

La présente invention a encore pour objet une 10 composition thérapeutique qui comprend comme composé actif, la protéine 17 KD et/ou des fragments ou des homologues de celle-ci, notamment pour le traitement de troubles requérant l'inhibition ou l'augmentation de la croissance des vaisseaux sanguins.

15 Les compositions thérapeutiques conformes à l'invention peuvent être utilisées dans toutes les pathologies dans lesquelles existe un problème de vascularisation, et notamment plaies, escarres, ulcères, greffes, insuffisances circulatoires. Elles peuvent également utilisées en 20 cosmétologie (peau, cuir chevelu). Elles peuvent aussi être utilisées dans le domaine vétérinaire, notamment dans le diagnostic de mammites et la sélection de vaches lactantes.

La présente invention a également pour objet un réactif immunologique de détection ou de dosage des angiogénines de mammifères, caractérisé en ce qu'il est choisi dans 25 le groupe qui comprend des anticorps anti-protéine 17 KD, des anticorps anti-peptide, notamment des anticorps contre l'un des peptides définis ci-dessus, lesquels anticorps étant utilisés seuls ou en mélange.

30 La présente invention a également pour objet un procédé de détection et de dosage des angiogénines de mammifères dans des fluides biologiques, caractérisé en ce que l'on fait réagir, dans des conditions appropriées, un anticorps anti-angiogénine, notamment un anticorps anti-protéine 35 17 KD ou un anticorps anti-peptide, conformes à l'invention

- 8 -

avec un fluide biologique supposé contenir ladite angiogénine, la lecture de la réaction étant effectuée par un moyen approprié, tel que notamment RIA, ELISA, Immunofluorescence.

5 La présente invention a en outre pour objet un kit de détection et/ou de dosage, dans des fluides biologiques, d'angiogénine de mammifères et notamment de l'angiogénine humaine, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 10 - une quantité appropriée, éventuellement subdivisée en doses unitaires, d'anticorps anti-angiogénine, en particulier d'anticorps anti-protéine 17 KD ou d'anticorps anti-peptide, notamment d'anticorps contre l'un des peptides définis ci-dessus ;
- 15 - éventuellement une quantité appropriée de tampons, diluants, réactifs, nécessaires à la mise en oeuvre de ladite détection et/ou dosage.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à un exemple de préparation de la protéine selon l'invention, ainsi qu'à un compte-rendu d'expérimentations effectuées :

- 25 - pour démontrer l'homologie angiogénine humaine/protéine 17 KD d'origine bovine, selon l'invention ;
- pour démontrer l'homologie avec la ribonucléase ;
- pour démontrer l'activité sur l'angiogénèse de ladite protéine 17 KD d'origine bovine.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples et ce compte-rendu d'expérimentations sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE A : EXTRACTION DE LA PROTEINE 17 KD DU LAIT DE VACHE

50 litres de lait de vache sont délipidés par centrifugation (4 000 xg - 30 mn - 4°C) et chromatographiés sur 35 une colonne de SP-Sephadex C50 (10 x100 cm) (Pharmacia).

- 9 -

La colonne est lavée par 10 l d'une solution d'acétate de sodium 0,35 M pH 7, puis est éluée par 5 l d'acétate de sodium 1,5 M pH 8. La solution obtenue est diluée de manière à obtenir une concentration en acétate de sodium 0,2 M. Cette solution est chromatographiée sur une colonne de S-Sepharose Fast Flow (10 x 100 cm) (Pharmacia) préalablement équilibrée avec de l'acétate de sodium 0,22 M pH 6,5. Après lavage de la colonne par la même solution d'acétate, l'élution de la protéine est réalisée par un litre 10 d'une solution d'acétate de sodium 0,4 M.

Cette solution est dessalée par chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Bio-gel P-30 (4 x 100 cm).

Après élution de la colonne à l'eau, la fraction renfermant la protéine est chromatographiée sur une colonne de 15 Phényl Superose HR5/5 (Pharmacia) par F.P.L.C. (Fast Protein Liquid Chromatography). L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient obtenu en mélangeant le tampon A : Phosphate de sodium 50 mM, sulfate d'ammonium 1,7 M pH 7, avec le tampon B : phosphate de sodium 50 mM pH 7 (temps 0 minute : 100 % TpA ; temps 15 minutes : 100 % TpA ; temps 40 minutes : 0 % TpA).

La Figure 1 annexée représente le diagramme d'élution de la protéine 17 KD de la colonne de Phényl Superose, avec en abscisse le temps en minutes, et en ordonnée les densités optiques. Le pic 2 renferme la protéine 17 KD pure. Le 25 rendement est de 25 mg de protéine, soit 0,5 mg/l de lait délipidé.

#### TESTS

##### EXEMPLE 1 : HOMOLOGIE ANGIOGENINE HUMAINE/PROTEINE 17 KD

Les données dont nous disposons sur la protéine 30 17 KD font apparaître sa parenté avec l'angiogénine humaine ; en effet, 81 amino-acides sont communs aux deux protéines :

L'analyse en amino-acides, évaluée pour l'angiogénine humaine et déterminée après hydrolyse acide totale pour la protéine 17 KD d'origine bovine (Tableau I ci-après) 35 montre que les deux protéines possèdent des compositions très proches.

- 10 -

TABLEAU I

5  
ANALYSE COMPAREE DES AMINO-ACIDES DE  
L'ANGIOGENINE HUMAINE ET DE LA PROTEINE  
17 KD D'ORIGINE BOVINE

	HU	BO
Phe	5	6
Leu	6	4
Ile	7	9
Met	1	2
Val	5	4
Pro	8	7
Ser	9	6
15 Thr	8	6
Ala	5	4
Tyr	3	6
His	6	6
Glu(Gln)	10	10
20 Asp(Asn)	14	16
Lys	7	9
Cys	6	6
Trp	1	-
Arg	14	15
Gly	8	9
25 Total* :	116	119

\* sans Cys et Trp

30 La comparaison des séquences de l'angiogénine humaine et de la protéine 17 KD d'origine bovin qui figure au Tableau II ci-après, montre une homologie supérieure à 60 %. La plupart des différences sont le résultat de remplacements conservatifs.

35 Les 6 restes cystéines sont en même position, ce

- 11 -

qui indique une structure tertiaire similaire à celle de l'angiogénine humaine, un seul espace nécessaire dans la région C-terminale pour l'alignement ; seulement les zones N et C terminales sont responsables de la différence de taille entre les deux protéines (la protéine 17 KD a deux amino-acides de plus que l'angiogénine humaine).

Cependant, à la différence de l'angiogénine humaine, qui a, en position N-terminale, un acide pyroglutamique, la protéine 17 KD d'origine bovine a une alanine supplémentaire en position N-terminale.

Cette différence s'explique par la présence d'un peptide signal de 24 (ou 22) amino-acides (FETT J. et al. Biochem., (1985), 24, 5480), révélé par le séquençage des cDNA codant pour l'angiogénine humaine ; la suppression de ce peptide se produit lors du traitement par la peptidase signal, qui clive entre l'alanine et la glutamine dans :

Pro-Pro-Thr-Leu-Ala<sup>-1</sup>-Glu<sup>+1</sup>-Asp-Asn..., dans l'angiogénine humaine, alors que la présence de l'alanine N-terminale, en ce qui concerne la protéine 17 KD d'origine bovine, est due au déplacement de la liaison clivée par la peptidase signal, laissant ainsi une alanine supplémentaire en position N-terminale, évitant la modification en acide pyroglutamique observée dans l'angiogénine humaine.

La séquence de la protéine 17KD telle qu'elle figure au Tableau II, ci-après, a été déterminée par les techniques classiques de séquençage des protéines.

30



35

10  
20  
30  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100  
110  
120  
130  
140  
150

TABLEAU II

## SEQUENCES COMPAREES PROTEINE 17KD/ANGIOGENINE

1	Protéine 17 KD Angiogénine humaine	Ala Gln Asp Asp Tyr Arg Tyr Ile His Phe Leu Thr Gln His Tyr Asp Ala Lys Pro Lys Gly Arg Asn Asp
5		Gln Asp Asn Ser Arg Tyr Ile His Phe Leu Thr Gln His Thr Asp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Asp Asp
10		
15		
20		
25	Protéine 17 KD Angiogénine humaine	Glu Tyr Cys Phe Asn Met Met Lys Asn Arg Arg Tyr Cys Glu Ser Ile Met Arg Arg Gly
30		Arg Arg Gly Ile
35		
40		
45	Protéine 17 KD Angiogénine humaine	Asn Thr Phe Ile His Gly Asn Lys Asn Asp Ile Lys Ala Ile Cys Glu Asp Arg Ser Ile Lys Ala Ile Cys Glu Lys
50		Asn Thr Phe Ile His Gly Asn Lys Arg Ser Ile Lys Ala Ile Cys Glu Lys
55		
60		
65		
70	Protéine 17 KD Angiogénine humaine	Gly Asp Leu Arg Ile Ser Lys Ser Glu Phe Gln Ile Thr Cys Lys His Lys Gly Ser Ser Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ser Ser Phe Gln Val Thr Cys Lys Ile His Gly Ser Pro Trp
75		
80		
85		
90		
95	Protéine 17 KD Angiogénine humaine	Pro Pro Cys Arg Tyr Gly Ala Thr Glu Asp Ser Arg Val Ile Val Val Cys Glu Asn Gly Leu Pro Val His
100		Pro Pro Cys Gln Tyr Arg Ala Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val His
105		
110		
115		
120	Protéine 17 KD Angiogénine humaine	Phe Asp Glu Ser Phe Ile Thr Pro Arg His Leu Asp Gln Ser Ile Phe Arg Arg Pro
125		

- 13 -

EXEMPLE 2 - HOMOLOGIE AVEC LA RNASE :

R. SHAPIRO et al. (Biochem, (1986), 25, 3527-3532) ont montré que, en pratique, tous les restes de la séquence du site actif de la RNASE bovine sont conservés dans 5 l'angiogénine humaine.

De plus, l'observation qu'un inhibiteur de la ribonucléase humaine supprime à la fois l'activité angiogénique et ribonucléolytique de l'angiogénine humaine, confirme que 10 l'homologie angiogénine/RNASE est fonctionnellement significative.

Les résultats suivants confirment ces observations (Tableau III, ci-après) :

- la protéine 17 KD d'origine bovine partage une homologie similaire avec la RNASE bovine (39 % des restes étant identiques), à celle de l'angiogénine humaine pour la RNASE humaine (34 % des restes étant identiques).  
15 - mise à part la mutation Arg/Ile en position 43 et deux substitutions conservatives (Asp-69 pour Asn-68 et Phe 116 pour Leu-115), tous les restes qui sont connus pour être 20 impliqués dans l'activité ribonucléolytique sont préservés, tant dans l'angiogénine humaine que dans la protéine 17 KD d'origine bovine, indiquant une forte pression sélective pour le maintien de cette homologie fonctionnelle significative (Tableau III).

25 La substitution de la Leu-115 de l'angiogénine humaine par la Phe-116 de la protéine 17 KD d'origine bovine est d'un intérêt particulier : il a été montré, par exemple, que dans la RNASE, le remplacement de Phe par Leu faisait chuter l'activité d'un facteur 10. Ainsi, la présence de Phe-116 dans la protéine 17 KD, sous réserve que 30 l'activité RNASE soit directement impliquée dans son activité biologique, pourrait être une indication d'une activité supérieure à celle de l'angiogénine humaine.

- basée sur son homologie avec la ribonucléase A pancréatique : la structure tridimensionnelle de l'angiogénine 35

- 14 -

humaine a été évaluée lorsque les sites, sur lesquels les mutations ont porté, sont rapportés sur cette structure ; en ce cas, on peut observer que, à l'exception de la mutation Arg/Ile en position 43, toutes les substitutions qui surviennent dans la structure spatiale de la protéine, impliquées dans son activité ribonucléolytique, sont des substitutions conservatives.

10

15

20

25

30

35

TABLEAU III  
HOMOLOGIES ANGIOGENINE HUMAINE / PROTEINE 17 KD ET  
RNase BOVINE / HUMAINE

RNase Bovine	K	E	T	A	A	K	F	E	R	Q	H	M	D	S	S	T	S	A	S	S	S	N	Y	C	N	Q	M	M	K	S				
Proline 17 KD	A	Q	D	D	Y	R	Y	I	H	P	L	T	Q	H	Y	D	A	K	P	K	Q	R	N	D	E	-	Y	C	F	N	M	M	K	N
Angiogénine Humaine	<	Q	D	N	S	R	Y	T	H	F	L	T	Q	H	Y	D	A	K	P	Q	G	R	D	D	R	-	Y	C	B	S	T	M	R	R
RNase Humaine	K	E	S	R	A	K	K	F	Q	R	Q	H	M	D	S	D	S	S	P	S	S	T	Y	C	N	Q	M	M	R	R	R			
RNase Bovine	R	N	L	T	K	D	R	C	K	P	V	N	T	F	V	H	E	S	L	A	D	V	Q	A	V	C	S	Q	K	N	V	A		
Proline 17 KD	R	R	R	L	T	R	P	-	C	K	D	R	N	T	F	I	H	G	N	K	N	D	I	K	A	1	C	E	D	R	N	Q	Q	
Angiogénine Humaine	R	R	R	G	L	T	S	P	-	C	K	D	I	N	T	F	I	H	G	N	K	R	S	I	K	A	1	C	B	N	K	N	G	N
RNase Humaine	R	R	R	N	M	T	Q	G	R	C	K	P	V	N	T	F	V	H	E	P	L	V	Q	N	V	C	F	Q	B	K	V	T		
RNase Bovine	C	K	N	G	Q	T	N	C	Y	S	Y	S	T	M	S	I	T	D	C	R	B	T	G	S	S	K	Y	P	N	C	A			
Proline 17 KD	P	Y	R	G	-	-	D	L	R	I	S	K	S	E	F	Q	I	T	I	C	K	H	K	G	S	S	R	P	P	C	R			
Angiogénine Humaine	P	P	P	H	R	E	-	-	N	L	R	I	S	K	S	S	P	Q	V	T	T	C	K	L	H	G	S	P	W	P	P	C	Q	
RNase Humaine	C	K	N	G	Q	N	C	Y	K	S	N	S	S	S	M	H	I	T	D	C	R	L	T	N	G	S	R	Y	P	N	C	A		
RNase Bovine	Y	K	T	T	Q	A	N	K	H	I	I	V	A	C	E	G	N	P	Y	V	P	V	H	F	D	A	S	V						
Proline 17 KD	Y	Y	G	A	T	E	D	S	R	V	I	V	V	Q	C	E	-	N	G	-	L	P	V	H	P	D	E	S	F	I	T	P	R	H
Angiogénine Humaine	Y	Y	R	A	T	A	G	F	R	N	V	V	V	A	C	E	-	N	G	-	L	P	V	H	L	D	Q	S	I	F	R	R	P	
RNase Humaine	Y	R	T	S	P	K	E	R	H	I	T	V	A	C	E	G	S	P	Y	V	P	V	H	F	D	A	S	V	E	D	S			

- 16 -

**EXEMPLE 3 - PROPRIETES BIOLOGIQUES DE LA PROTEINE 17 KD**  
**D'ORIGINE BOVINE.**

- Test de la membrane chorio-allantoïque de l'oeuf de la poule :

5 Ce test d'activité biologique a été décrit par FETT et al. (Biochem, (1985), 24, 5480-5486). Ce test consiste à apprécier le développement de vaisseaux sanguins au niveau de la membrane chorio-allantoïque de l'embryon de Poulet après application de quantités croissantes de protéine 17 KD 10 d'origine bovine de l'ordre de 10 ng à 1 µg. Sur 80 oeufs fécondés qui ont été expérimentés en présence de la protéine 17 KD, il a été observé un développement de nouveaux vaisseaux sanguins dans 62 oeufs pour une quantité d'angiogénine de 50 ng. Ces résultats démontrent que la 15 protéine 17 KD selon l'invention possède un effet sur l'organogenèse et la croissance des vaisseaux sanguins.

Les oeufs fécondés sont placés dans une couveuse à 38°C en atmosphère à 70 % d'humidité.

20 Après 3 jours, une fenêtre est ouverte dans la coquille et est fermée par une membrane perméable aux gaz.

Au 5ème jour, un disque d'une membrane imbibée de la solution de protéine 17 KD est implanté sur la membrane chorio-allantoïque.

25 Le développement des vaisseaux sanguins qui convergent vers le disque imbibé d'angiogénine est suivi à la loupe binoculaire au 8ème, 9ème et 10ème jours.

La protéine 17 KD d'origine bovine conforme à l'invention peut être utilisée sous une forme pharmaceutiquement acceptable pour le traitement des troubles 30 requérant l'inhibition ou l'augmentation de la croissance des vaisseaux sanguins chez l'Homme.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de 35 façon explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les

- 17 -

variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarte du cadre, ni de la portée de la présente invention.

- 18 -

REVENDICATIONS

1°) Protéine, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence qui comporte 125 amino-acides, et répond à la formule I ci-après :

5           Ala<sup>1</sup>-Gln-Asp-Asp-Tyr<sup>5</sup>-Arg-Tyr-Ile-His-Phe<sup>10</sup>-  
          Leu-Thr-Gln-His-Tyr<sup>15</sup>-Asp-Ala-Lys-Pro-Lys<sup>20</sup>-  
          Gly-Arg-Asn-Asp-Glu<sup>25</sup>-Tyr-Cys-Phe-Asn-Met<sup>30</sup>-  
          Met-Lys-Asn-Arg-Arg<sup>35</sup>-Leu-Thr-Arg-Pro-Cys<sup>40</sup>  
10           (I)    Lys-Arg-Arg-Asn-Asn-Thr<sup>45</sup>-Phe-Ile-His-Gly-Asn<sup>50</sup>-  
          Lys-Asn-Arg-Ile-Lys<sup>55</sup>-Ala-Ile-Cys-Glu-Asp<sup>60</sup>-  
          Arg-Asn-Gly-Glu-Pro<sup>65</sup>-Tyr-Arg-Gly-Asp-Leu<sup>70</sup>-  
          Arg-Ile-Ser-Lys-Ser<sup>75</sup>-Glu-Phe-Gln-Ile-Thr<sup>80</sup>-  
          Ile-Cys-Lys-His-Lys<sup>85</sup>-Gly-Gly-Ser-Ser-Arg<sup>90</sup>-  
          Pro-Pro-Cys-Arg-Tyr<sup>95</sup>-Gly-Ala-Thr-Glu-Asp<sup>100</sup>-  
15           Ser-Arg-Val-Ile-Val<sup>105</sup>-Val-Gly-Cys-Glu-Asn<sup>110</sup>-  
          Gly-Leu-Pro-Val-His<sup>115</sup>-Phe-Asp-Glu-Ser-Phe<sup>120</sup>-  
          Ile-Thr-Pro-Arg-His<sup>125</sup>-OH,

en ce que 81 amino-acides de sa séquence sont communs avec l'angiogénine humaine et en ce que son poids moléculaire est 20 d'environ 17 KD.

2°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par extraction de lait de mammifères, notamment de vache.

3°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée 25 en ce qu'elle est obtenue par clonage.

4°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par voie de synthèse.

5°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence suivante en amino-acides :

Glu-Asp<sup>60</sup>-Arg-Asn-Gly-Gln-Pro-Tyr-Arg-Gly-Asp-  
Leu<sup>70</sup>-Arg-Ile-Ser

dont 9 restes sur 15 s'alignent sur la séquence 58-72 de 35 l'angiogénine humaine.

- 19 -

6°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue le fragment C-terminal de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence en amino-acides suivante :

5 Phe-Asp-Glu-Ser-Phe<sup>120</sup>-Ile-Thr-Pro-Arg-His<sup>125</sup>

7°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence suivante en amino-acides :

10 Glu-Asn<sup>110</sup>-Gly-Leu-Pro-Val-His<sup>115</sup>-Phe  
dont 7 restes sur 8 s'alignent sur la séquence 108-115 de l'angiogénine humaine.

15 8°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence en amino-acides suivante :

Ile-Val<sup>105</sup>-Val-Gly-Cys-Glu

dont 4 restes sur 6 s'alignent sur la séquence 103-108 de l'angiogénine humaine.

20 9°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence suivante en amino-acides:

Arg-Tyr-Ile-His-Phe<sup>10</sup>-Leu-Thr-Gln-His-Tyr<sup>15</sup>-Asp-Ala-Lys  
25 dont 11 restes sur 13 s'alignent sur la séquence 5-17 de l'angiogénine humaine.

30 10°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence suivante en amino-acides :

Asn-Thr<sup>45</sup>-Phe-Ile-His-Gly-Asn<sup>50</sup>-Lys,  
qui se distingue par une homologie totale avec la séquence 43-50 de l'angiogénine humaine.

35 11°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendi-

- 20 -

cations 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence suivante en amino-acides :

Ile-Lys<sup>55</sup>-Ala-Ile-Cys-Glu,

qui se distingue également par une homologie totale avec la

5 séquence 53-58 de l'angiogénine humaine.

12°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence suivante en amino-acides :

10 Leu<sup>70</sup>-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser<sup>75</sup>-Glu-Phe-Gln

dont 8 restes sur 10 s'alignent sur la séquence 69-77 de l'angiogénine humaine.

13°) Peptide, caractérisé en ce qu'il constitue un fragment de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence suivante en amino-acides :

Arg<sup>67</sup>-Gly-Asp,

ledit peptide étant reconnu par un récepteur des cellules endothéliales.

20 14°) Procédé d'obtention de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que ladite protéine est extraite de lait de mammifère, notamment de vache.

25 15°) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'extraction est réalisée par chromatographie par échange de cations, suivie d'une élution par un éluant approprié.

30 16°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 et 15, caractérisé en ce que l'éluant est un sel alcalin d'un acide organique faible, notamment de l'acétate de sodium.

17°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisé en ce que la fraction éluée est soumise à une deuxième chromatographie par échange de cations, suivie d'une deuxième élution par un éluant approprié.

- 21 -

18°) Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'éluant est un sel alcalin d'un acide organique faible, notamment de l'acétate de sodium.

5 19°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel-filtration.

10 20°) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le lait est préalablement délipidé par centrifugation.

15 21°) Composition thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme composé actif, la protéine 17 KD selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou des fragments, selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 où des homologues de celle-ci.

20 22°) Réactif immunologique de détection ou de dosage des angiogénines de mammifères, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe qui comprend des anticorps contre la protéine 17 KD selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, des anticorps anti-peptide, notamment des anticorps contre l'un des peptides selon l'une quelconque des revendications 5 à 13, lesquels anticorps sont utilisés seuls ou en mélange.

25 23°) Procédé de détection et de dosage des angiogénines de mammifères dans des fluides biologiques, caractérisé en ce que l'on fait réagir, dans des conditions appropriées, un anticorps anti-angiogénine, notamment un anticorps anti-protéine 17 KD ou un anticorps anti-peptide, selon la revendication 22, avec un fluide biologique supposé contenir l'anti-angiogénine, la lecture de la réaction étant effectuée par un moyen approprié, tel que notamment test RIA, ELISA, d'immunofluorescence.

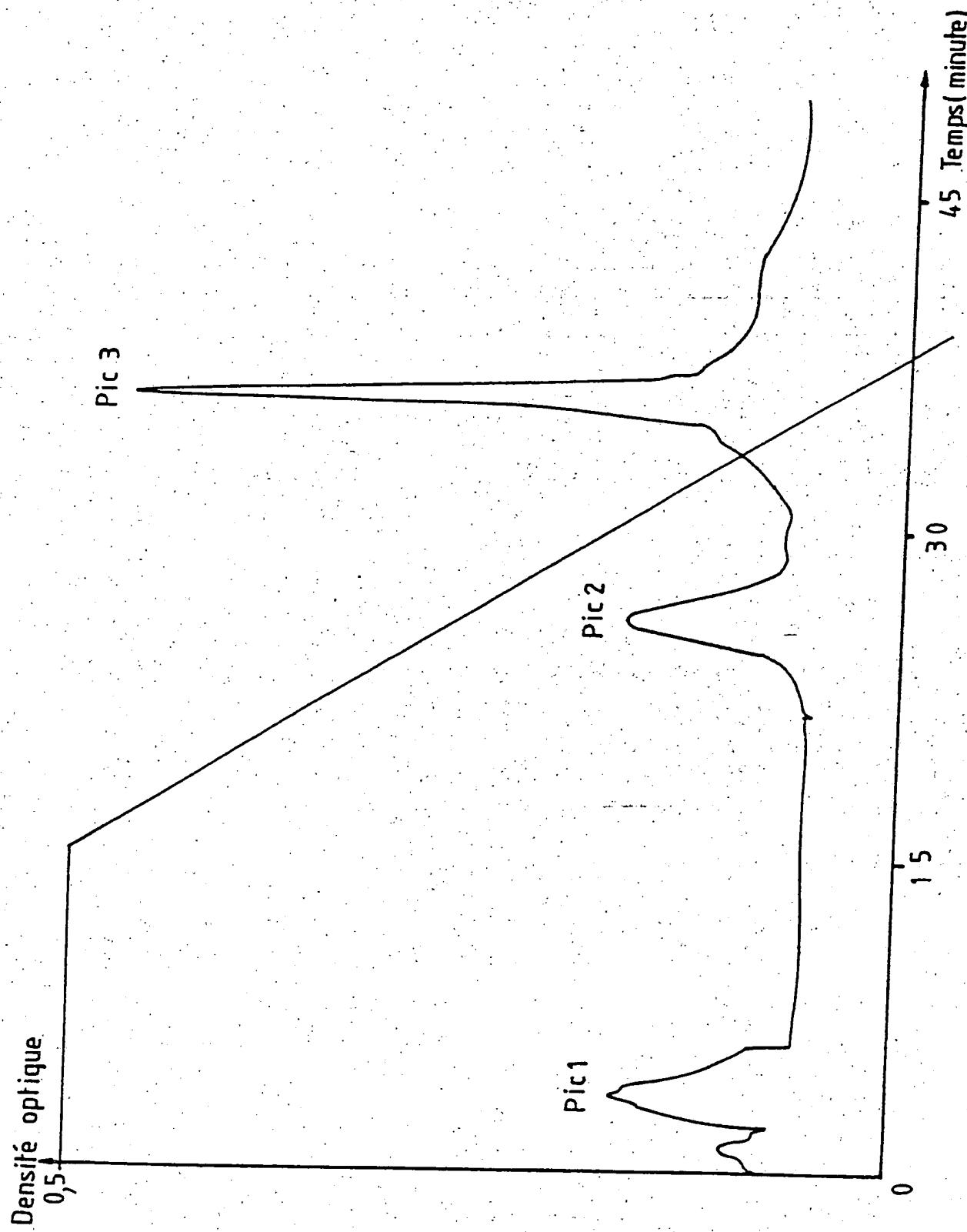
30 24°) Kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi, pour la détection et/ou le dosage, dans des fluides biologiques, d'angiogénines de mammifère et notamment de l'angiogénine humaine, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 22 -

- une quantité appropriée, éventuellement subdivisée en doses unitaires, d'anticorps anti-angiogénine, notamment d'anticorps anti-protéine 17 KD ou d'anticorps anti-peptides selon la revendication 22.
- 5 - éventuellement une quantité appropriée de tampons, diluants, réactifs, nécessaires à la mise en oeuvre de ladite détection et/ou dosage.

10

1 / 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00566

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>4</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl. <sup>4</sup> C 07 K 13/00; 7/06; 7/08; C 12 P 21/02; A 61 K 37/02

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. <sup>4</sup>	C 07 K; A 61 K; C 12 P

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>9</sup>

Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	Biochemistry, volume 24, Nr. 20, 24 September 1985, American Chemical Society (US) J.W. Fett et al.: "Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells", pages 5480-5486 cited in the application --	
A	Biochemistry, volume 24, Nr. 20, 24 September 1985, American Chemical Society (US) D.J. Strydom et al.: "Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin", pages 5486-5494 cited in the application --	
A	Biochemistry, volume 24, Nr. 20, 24 September 1985, American Chemical Society (US) K. Kurachi et al.: "Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor", pages 5494-5499 cited in the application --	

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

28 February 1989 (28.02.89)

Date of Mailing of this International Search Report

23 March 1989 (23.03.89)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Biochemistry, volume 26, Nr. 16, 11 August 1987, American Chemistry Society (US) R. Shapiro et al.: "Isolation of angiogenin from normal human plasma", pages 5141-5146	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00566

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB <sup>4</sup>: C 07 K 13/00; 7/06; 7/08; C 12 P 21/02; A 61 K 37/02

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée <sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification
CIB <sup>4</sup>	C 07 K; A 61 K; C 12 P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS <sup>10</sup>

Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
A	Biochemistry, vol. 24, no. 20, 24 septembre 1985, American Chemical Society (US) J.W. Fett et al.: "Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells", pages 5480-5486 (cité dans la demande)	--
A	Biochemistry, vol. 24, no. 20, 24 septembre 1985, American Chemical Society (US) D.J. Strydom et al.: "Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin", pages 5486-5494 (cité dans la demande)	--

### \* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup>

- « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

« & » document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  28 février 1989	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  23.03.89
Administration chargée de la recherche internationale  OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé  P.C.G. VAN DER PUTTEN

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		N° des revendications visées
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	
A	Biochemistry, vol. 24, no. 20, 24 septembre 1985, American Chemical Society (US) K. Kurachi et al.: "Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor", pages 5494-5499 (cité dans la demande) --	
A	Biochemistry, vol. 26, no. 16, 11 août 1987, American Chemical Society (US) R. Shapiro et al.: "Isolation of angiogenin from normal human plasma", pages 5141-5146	